



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia



ALINE PATRÍCIA GONÇALVES

Estudo da interação entre plaquetas e leptospiras

São Paulo

2019

RESUMO

GONÇALVES, A. P. **Estudo da interação entre plaquetas e leptospiras.** [Study of the interaction between platelets and leptospires]. 2019. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A leptospirose é uma zoonose mundialmente disseminada e endêmica nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. É causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, que colonizam os túbulos renais proximais de animais domésticos ou silvestres e são eliminadas no ambiente externo pela urina. A transmissão ocorre por meio de contato direto com tecidos, fluidos corporais e urina de animais infectados, ou pela exposição à água ou solo contaminado. Esta doença apresenta grande impacto na saúde pública, além de ser responsável por prejuízos na economia pecuária, pois interfere na produção de leite e causa distúrbios reprodutivos nos animais de criação, como abortamentos e infertilidades. As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos, abundantes no sangue e originados dos megacariócitos da medula óssea. Classicamente, são conhecidas por atuarem no processo de hemostasia, garantindo a manutenção do fluxo sanguíneo e da integridade vascular. No entanto, vários estudos têm demonstrado que as plaquetas, também, participam de processos inflamatórios, do reparo de tecidos, da angiogênese e de mecanismos de defesa do organismo a infecções. Na forma grave da leptospirose, a trombocitopenia tem sido relatada. Provavelmente, os baixos níveis de plaquetas no sangue ocorrem devido à lesão vascular e ao aumento no consumo de plaquetas nas hemorragias observadas durante a infecção por leptospiras. A trombocitopenia também pode ser causada pela ação direta das leptospiras sobre as plaquetas. Neste trabalho, foi investigado a existência de uma possível interação das leptospiras com as plaquetas. Os resultados obtidos, mostraram que os protocolos utilizados para a obtenção das amostras de sangue total, plasma rico em plaquetas e plaquetas lavadas são adequados para a avaliação da possível capacidade das leptospiras em ativar plaquetas. Entretanto, nenhuma das estirpes de leptospiras testadas foram capazes de ativar diretamente as plaquetas em um tempo máximo de 45 minutos, mesmo com diferentes proporções de bactéria:plaqueta. As leptospiras também foram avaliadas quanto a sua capacidade de alterar a agregação plaquetária provocada por agonistas conhecidos (colágeno, TRAP ou ADP). Apesar da agregação

plaquetária na presença das leptospiros serem semelhantes ou maiores que o controle positivo, esses valores não foram estatisticamente significantes. Um lisado total da estirpe patogênica de leptospira, L1-130, foi avaliado quanto a capacidade de se ligar a lisados de diferentes frações plaquetárias, previamente ativadas ou não por ADP, através de ensaios de ELISA. O lisado da fração de plaquetas lavadas foi o único que apresentou valores significativos de interação com o lisado de L1-130. Por último, as plaquetas foram avaliadas quanto a sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano, com o indicador de crescimento Resazurina. Estes ensaios não foram capazes de identificar uma ação microbicida por parte das plaquetas sobre a estirpe de leptospira utilizada. Os resultados obtidos, neste trabalho, mostraram que as leptospiros não foram capazes de ativar diretamente a agregação plaquetária, porém, a hipótese de interação entre as plaquetas e as leptospiros não deve ser totalmente descartada, uma vez que a fração de plaquetas lavadas foi capaz de aderir ao lisado da estirpe L1-130, por isso novos estudos devem ser realizados.

Palavras-chave: Leptospirose. Leptospira. Plaquetas humanas. Agregação plaquetária. Atividade microbicida.

ABSTRACT

GONÇALVES, A. P. **Study of the interaction between platelets and leptospire.** [Estudo da interação entre plaquetas e leptospiras]. 2019. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Leptospirosis is a widespread and endemic zoonosis in the tropical and subtropical regions of the world. It is caused by pathogenic spirochetes of the *Leptospira* genus, which colonize the proximal renal tubules of domestic or wild animals and are excreted in the environment by the urine. Transmission occurs through the direct contact with tissues, body fluids, and urine of infected animals, or through exposure to contaminated water or soil. This disease has great impact on public health, besides being responsible for losses in the livestock economy, because it interferes in the milk production and causes reproductive disorders in the livestock, such as abortion and infertility. Platelets are small cytoplasmic fragments, abundant in the blood and originated from the megakaryocytes of the bone marrow. Classically, they are known to act in the process of hemostasis, ensuring the maintenance of the blood flow and the vascular integrity. However, several studies have shown that platelets also participate in inflammatory processes, tissue repair, angiogenesis and mechanisms of defense of the body to infections. In the severe form of leptospirosis, thrombocytopenia has been reported. It is probable that the low platelet levels in the blood occur due to vascular injury and due to an increase in the consumption of blood, both observed during leptospiral infection. Thrombocytopenia can also be caused by the direct action of leptospire on platelets. In this work, the existence of a possible interaction between leptospire and human platelets was investigated. The results showed that the protocols used to obtain the samples of whole blood, platelet rich plasma and washed platelets are adequate for the evaluation of the possible ability of leptospire to activate platelets. However, none of the leptospira strains tested were able to directly activate the platelets in a maximum time of 45 minutes, even with different proportions of bacterium:platelet. Leptospire were also evaluated for their ability to alter platelet aggregation caused by known agonists (collagen, TRAP or ADP). Although platelet aggregation in the presence of leptospire was similar to or greater than the positive control, these values were not

statistically significant. The total lysate of the pathogenic strain of leptospira, L1-130, was evaluated for the ability to bind to lysates of different platelet fractions, previously activated or not by ADP, by ELISA. The lysate of the washed platelets fraction was the only one that presented significant values of interaction with the L1-130 lysate. Finally, platelets were evaluated for their ability to inhibit bacterial growth, with the Resazurin growth indicator. These assays were not able to identify a microbicidal action by the platelets on the used leptospira strain. The results obtained in this work show that leptospire were not able to directly activate platelet aggregation, however, the hypothesis of interaction between platelets and leptospire should not be totally discarded, since some the washed platelet lysate was able to bind to the strain L1-130 lysate, so further studies should be carried out on this subject.

Keywords: Leptospirosis. Leptospira. Human platelets. Platelet aggregation. Microbicidal activity.